

METHOD OF PURIFYING COLLAGEN

Patent number: JP62083849
Publication date: 1987-04-17
Inventor: YOSHINAKA REIJI; SATO KENJI; SATO MAMORU
Applicant: YOSHINAKA REIJI; SATO KENJI; SATO MAMORU
Classification:
- international: **A23J1/02; A23J1/10; A23J3/06; C09H1/00; C09H3/00; A23J1/00; A23J3/00; C09H1/00; C09H3/00; (IPC1-7): A23J1/02; A23J1/10**
- european:
Application number: JP19850222289 19851004
Priority number(s): JP19850222289 19851004

Report a data error here

Abstract of JP62083849

PURPOSE:To obtain high-purity collagen in high yield, by extracting and removing substances except collagen from collagen-containing animal tissue with a dilute alkali solution having \leq a given concentration, to remove non-collagen substance efficiently. **CONSTITUTION:**Collagen-containing animal tissue obtained by grinding or fine crushing by a common device and method is blended with ≤ 1.0 N, preferably ≤ 0.5 dilute alkali solution by stirring, shaking, etc. NaOH, KOH, etc., are used as the alkali. Non-collagen substances are extracted in the alkali solution by the blending treatment and removed, to give high-purity collagen as an extraction residue. The alkali treatment is carried out preferably at \leq room temperature usually. When unmodified collagen is purified, a temperature condition not to denature collagen by heat is required.

.....
Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-83849

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)4月17日

A 23 J 1/02
1/107236-4B
7236-4B

審査請求 有 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 コラーゲンの精製法

⑯ 特 願 昭60-222289

⑰ 出 願 昭60(1985)10月4日

⑱ 発明者	吉 中 禮 二	京都府綴喜郡田辺町大字河原小字里ノ内33-2
⑱ 発明者	佐 藤 健 司	京都市左京区銀閣寺町44 山本方
⑱ 発明者	佐 藤 守	城陽市寺田深谷64-25
⑰ 出願人	吉 中 礼 二	京都府綴喜郡田辺町大字河原小字里ノ内33-2
⑰ 出願人	佐 藤 健 司	京都市左京区銀閣寺町44 山本方
⑰ 出願人	佐 藤 守	城陽市寺田深谷64-25
⑲ 代理人	弁理士 松本 武彦	

明 細 書

1. 発明の名称

コラーゲンの精製法

2. 特許請求の範囲

(1) 高純度のコラーゲンまたはゼラチンを得るためのコラーゲンの精製法であって、コラーゲンを含有する動物組織からコラーゲン以外の物質を1.0規定以下の濃度の希アルカリ溶液によって抽出して除去するコラーゲンの精製法。

3. 発明の詳細な説明

〔技術分野〕

この発明は、コラーゲンを含有する動物組織から、コラーゲン以外の物質を除去し、高純度のコラーゲンまたはゼラチンを得るためのコラーゲンの精製法に関する。

〔背景技術〕

一般に動物組織内において、コラーゲンは、組織を構成している他の成分、例えば、プロテオグリカン、糖タンパク質、無機質等との密接な相互作用によって不溶化している。したがって、この

ような動物組織から高純度のコラーゲンを得る場合には、前述したようなコラーゲン以外の物質（非コラーゲン物質）を除去するために、たとえば、次のような精製法が行われている。

すなわち、まず、原料である動物組織に付着している非コラーゲン物質を物理的に、できるだけ取り除く。つぎに、残ったコラーゲンに対し、溶解、沈殿の操作を繰り返して非コラーゲン物質を取り除き、高純度のコラーゲンを得る。

しかしながら、このような精製法では、コラーゲンの損失があって十分な収量が得られず、また、コスト面でも満足できるものではなかった。

〔発明の目的〕

この発明は、以上の問題に鑑みてなされたものであって、コラーゲンを含有する動物組織から、効率よく非コラーゲン物質を除去し、高純度のコラーゲンを高収率で得るためのコラーゲンの精製法を提供することを目的としている。

なお、ゼラチンはコラーゲンの熱変性物であることから、この発明は、高純度のゼラチンを高収

率で得るためのコラーゲンの精製法を提供することをも目的としている。

〔発明の開示〕

以上の目的を達成するため、この発明は、高純度のコラーゲンまたはゼラチンを得るためのコラーゲンの精製法であって、コラーゲンを含有する動物組織からコラーゲン以外の物質を1.0規定以下の濃度の希アルカリ溶液によって抽出して除去するコラーゲンの精製法を要旨としている。

以下に、この発明をくわしく説明する。

まず、コラーゲンを含有する動物組織を、通常の装置、方法で摩砕あるいは、こまかく粉碎して試料を得る。このとき、動物組織が骨などの硬組織である場合には、この試料に対し、適当な方法で脱灰処理を行い、動物組織が骨などの硬組織でない場合には、試料をそのまま使用する。

以上のような試料に対し、非コラーゲン物質を溶かす1.0規定以下、好ましくは0.5規定以下の希アルカリ溶液を添加し、攪拌あるいは振とうなどの方法によって混合する。前述したような性質

を有する希アルカリ溶液に使用されるアルカリ化合物としては、種々のものが考えられるが、例えば次のような化合物が、この発明に好ましいアルカリ化合物としてあげられる。

水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウムおよびアンモニア等。

以上のようなアルカリ化合物を用いてコラーゲンを処理する方法は、従来にも種々報告されていた。たとえば、このような報文の一例として、(1)

C.D.Hey and G.Stainsby: *Biochim. Biophys. Acta*, 97, 364-366 (1965)、(2) G.D.Kemp and G.R. Tristram: *Biochem. J.*, 124, 915-919 (1971)、(3) R.J.A.Grand and G.Stainsby: *J. Sci. Food Agric.*, 26, 295-302 (1975)、等があげられる。しかしながら、これらの報告は、いずれも、コラーゲンの精製のみを目的とするものではなく、不溶性コラーゲンを酸等に対して可溶化することを主な目的とするものであった。これらの報告による方法は、1.25～4規定程度の高濃度のアルカリ水溶液を用いるものであるため、温度等の条件管理がむ

ずかしかった。また、これらの方法では、目的とする、不溶性コラーゲン分子内あるいは分子間架橋の切断による可溶化反応の他に、コラーゲン分子自体の分解および変性反応が発生する恐れもあるなど、実用性に乏しいものであった。

これに対し、この発明は、前述したように、1.0規定以下の濃度の希アルカリ溶液を使用することによって、コラーゲンの精製を行うことを目的としたものであり、これによれば、コラーゲン分子の分解や変性を避けることが容易となる。アルカリ処理の温度は、この発明では特に限定されず、使用する動物組織の種類および処理時間によって変動させることができるが、通常は室温以下で行うことが好ましい。特に、未変性コラーゲンを精製する場合には、コラーゲンが熱により変性しない温度条件で行うことが必要となる。たとえば、動物組織として、哺乳動物組織を使用する場合には、処理温度を15℃以下に、魚類などの変温動物組織を使用する場合には、処理温度を5℃以下にそれぞれ保つことで、コラーゲンの変性を防

ぐことができるようになる。

以上のようなアルカリ処理の時間も、この発明では特に限定されないが、通常は、ほぼ1～4日間の処理を行えば、非コラーゲン物質はアルカリ溶液中に抽出されて除去されてしまい、いわば、抽出残渣として高純度のコラーゲンが得られるのである。

このようにして得られた高純度のコラーゲンからは、例えば中性塩可溶性コラーゲン、酸可溶性コラーゲン、蛋白分解酵素処理コラーゲンおよびゼラチン等の製品を通常の方法によって製造することができる。その場合には、原料であるコラーゲンが、前述したように不純物を含まない高純度のものであるため、工程を簡略化することができ、しかも、出来あがった製品の純度をも高純度に行うのである。

以上のように、この発明のコラーゲンの精製法では、1.0規定以下という低い濃度の希アルカリ溶液によって処理を行うようになっているため、コラーゲン自体はほとんど変性を受けることがな

く、また、ほとんどのコラーゲンは抽出されずに抽出残渣として残る。ところが、動物組織を構成するコラーゲン以外の物質（非コラーゲン物質）は、前記希アルカリ溶液によって効率よく抽出され、ほぼ完全に除去されてしまう。このため、この発明のコラーゲンの精製法を用いれば、高純度のコラーゲンまたはゼラチンを、高収率で得ることが可能となるのである。

つぎに、この発明の実施例について、くわしく説明する。

（実施例1）

上皮および皮下組織を取り除いたメバチマグロ皮100gを、冷水と共にポリトロンホモジナイザー（Kinematica社製）中に投入して磨砕を行ったあと、この磨砕物を遠心分離して沈澱物を得、試料とした。この試料に対し、10倍量の0.1規定水酸化ナトリウム水溶液を加え、4℃、24時間の攪拌を行って非コラーゲン物質を前記水酸化ナトリウム水溶液中に抽出させた。このあと、遠心分離を行って非コラーゲン物質が抽出された水

酸化ナトリウム水溶液を除去し、沈澱物を抽出残渣とした。この抽出残渣に対し、前記非コラーゲン物質の抽出および遠心分離の操作をさらに2回くりかえして行い、抽出残渣を得て非コラーゲン物質の除去を終了した。

以上の操作で得られた抽出残渣を冷水で水洗したあと、100倍量の0.5規定酢酸を加えて攪拌を行い、酸可溶性コラーゲンを前記酢酸中に抽出させた。このものに対し、遠心分離を行って上清と沈澱物とを分離し、上清から前記酸可溶性コラーゲンを得た。このとき、メバチマグロ皮100gに対する酸可溶性コラーゲンの収量は、8.3gであった。なお、メバチマグロ皮の磨砕から、この酸可溶性コラーゲンの回収までの全工程は4℃の温度条件で行った。

酸可溶性コラーゲンを抽出したあとの抽出残渣である前記沈澱物を、水洗後、120℃のオートクレーブ中に入れ、熱水抽出してゼラチン（熱変性コラーゲン）を得た。このとき、メバチマグロ皮100gに対するゼラチンの収量は35.4gで

あった。

メバチマグロ皮100gに対する前記酸可溶性コラーゲンとゼラチンの収量はそれぞれの理論収量とほぼ等しく、他の画分への遺失は認められなかった。

以上の操作で得られた酸可溶性コラーゲンおよびゼラチンについて、その後の精製をせずに、そのままの状態ですDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動測定およびアミノ酸分析を行った結果、いずれのものについても、非コラーゲン物質を検出することはできず、これらのものが高純度であることがわかった。

さらに、酸可溶性コラーゲンの円二色性（Circular dichroism）を測定し、その結果から、221nmにおける平均残基分子楕円率を算出したところ、6000（deg・cm/dmol）であって、既知の未変性コラーゲンの値と一致するものであった。このことから、この実施例で得られた酸可溶性コラーゲンは未変性で、三重らせん構造を保持しており、この酸可溶性コラーゲンの出発物質であ

る前記非コラーゲン物質抽出残渣も未変性であったことが確認された。

（比較例）

つぎに、この発明の有効性を明らかにすることを目的として、以下のような比較試験を行った。

0.1規定水酸化ナトリウム水溶液による非コラーゲン物質の除去を行わなかった以外は、先の実施例1と同様にして、メバチマグロ皮から酸可溶性コラーゲンおよびゼラチンを製造した。その結果、メバチマグロ皮100gから酸可溶性コラーゲン8.7gとゼラチン36.6gが得られた。これらの製品について、DS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動測定およびアミノ酸分析を行った結果、酸可溶性コラーゲンからは0.3gの、ゼラチンからは1.3gの不純物が検出された。

このことから、この発明のコラーゲンの精製法を用いた先の実施例1では、いかに効率よく非コラーゲン物質が除去されていたかがわかった。

（実施例2）

マサバのアラ（頭骨、脊椎、ヒレ等）を肉挽機

にかけたあと、ワーリングブレンダー中に投入して磨砕し、アラ磨砕物を得た。このアラ磨砕物に、pH 7.3 に調整した 0.5 M エチレンジアミン四酢酸水溶液を加え、5℃で2日間の脱灰処理を行って試料とした。この試料に対し、0.5 規定の水酸化ナトリウム水溶液を加え、5℃、2日間の非コラーゲン物質抽出除去操作を行った。この非コラーゲン物質抽出除去操作を2回くりかえして行ったあと、その抽出残渣を120℃オートクレーブ中で熱水処理して、ゼラチンを得た。

アラ磨砕物に対するゼラチンの収量をしらべたところ、前記アラ磨砕物湿重量100gに対し、7.1gのゼラチンが得られたことがわかった。これは、ゼラチンのマサバアラからの理論収量とほぼ等しく、ほぼ100%のゼラチンが回収されたことがわかった。このことから、このゼラチンの出発物質である前記抽出残渣の収率もほぼ100%であったことが推測された。

また、このゼラチンについても、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動測定によって検定し

たところ、非コラーゲン物質の存在は認められなかった。

(実施例3)

上皮および皮下組織を取り除いたブタ皮を肉挽機で破砕したあと、氷冷しながら、さらに、微粉碎機(増幸産業社製、マスコロイダー)を用いて磨砕して試料とした。この試料について、実施例1と同様に、0.1 規定の水酸化ナトリウム水溶液を用いて非コラーゲン物質を抽出除去し、抽出残渣を得た。この抽出残渣中のコラーゲン含有量をヒドロキシプロリンの含量より算出したところ、乾重量中97重量%がコラーゲンであることがわかった。

以上の抽出残渣から、実施例1と同様の操作によって酸可溶性コラーゲンおよびゼラチンを製造したところ、ブタ皮100gに対し、0.4gの酸可溶性コラーゲンと、14.2gのゼラチンが得られた。また、この酸可溶性コラーゲンとゼラチンについて、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動測定によって検定したところ、いずれのもの

についても、非コラーゲン物質の存在は認められなかった。また、得られた酸可溶性コラーゲンについて、実施例1と同様に円二色性を測定した結果により、前記非コラーゲン物質抽出残渣が未変性であったことが確認された。

(発明の効果)

この発明のコラーゲンの精製法は、以上のように構成されており、1.0 規定以下という低い濃度の希アルカリ溶液によって処理を行うようにしているため、コラーゲン自体に変性を生じることなく、非コラーゲン物質が効率よく抽出除去され、結果として、コラーゲンを含有した動物組織から、高純度のコラーゲンまたはゼラチンを高収率で得ることが可能となっている。

代理人 弁理士 松 本 武 彦